

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-231799

(43)Date of publication of application : 05.09.1995

(51)Int.Cl.

C12Q 1/68

C12N 15/09

C12Q 1/34

C12Q 1/48

C12Q 1/66

(21)Application number : 06-318711

(71)Applicant : EIKEN CHEM CO LTD
TANABE SEIYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 21.12.1994

(72)Inventor : HASE SATORU
MASUBUCHI HARUMI

(30)Priority

Priority number : 05337863 Priority date : 28.12.1993 Priority country : JP

**(54) METHOD FOR DETECTING SPECIFIC POLYNUCLEOTIDE AND KIT FOR DETECTION
USED FOR THE SAME METHOD**

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide a method for detecting a polynucleotide containing a specific basic sequence existing in a sample effective in diagnosis for genetic diseases or infectious diseases and a kit for detecting the polynucleotide used in the detection method.

CONSTITUTION: This method for detecting a polynucleotide comprises hybridizing a polynucleotide in which the basic sequence to be detected is known with an oligonucleotide primer having a sequence complementary to a part of the polynucleotide and having nuclease resistance, adding at least one kind of deoxynucleoside triphosphoric acid, a DNA polymerase and a nuclease thereto, synthesizing a complementary strand of a base series adjacent to 3' end of a primer and complementary to the polynucleotide and successively decomposing the strand and repeating synthesis and decomposition of the complementary strand one or more times and detecting the produced pyrophosphate or deoxynucleoside monophosphoric acid. This kit for detection is used for the method for detecting the polynucleotide.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 16.06.2000

[Date of sending the examiner's decision of
rejection][Kind of final disposal of application other than
the examiner's decision of rejection or
application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3301876

[Date of registration] 26.04.2002

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-231799

(43)公開日 平成7年(1995)9月5日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 Q 1/68	Z N A A	9453-4B		
C 1 2 N 15/09				
C 1 2 Q 1/34		6807-4B		
1/48	Z	6807-4B		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
			審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 17 頁) 最終頁に続く	

(21)出願番号 特願平6-318711

(22)出願日 平成6年(1994)12月21日

(31)優先権主張番号 特願平5-337863

(32)優先日 平5(1993)12月28日

(33)優先権主張国 日本 (J P)

(71)出願人 000120456

榮研化学株式会社

東京都文京区本郷1丁目33番8号

(71)出願人 000002956

田辺製薬株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目2番10号

(72)発明者 長谷 哲

栃木県大田原市下石上1381-3 榮研化学株式会社免疫化学研究所内

(72)発明者 増淵 晴美

栃木県大田原市下石上1381-3 榮研化学株式会社免疫化学研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54)【発明の名称】 特定のポリヌクレオチドの検出方法及び当該方法に用いる検出用キット

(57)【要約】

【構成】 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドに、当該ポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、次いでこれに少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、DNAポリメラーゼ及びヌクレアーゼを加えて、前記プライマーの3'末端に隣接しかつ前記ポリヌクレオチドと相補的である塩基種を相補鎖合成し引き続いて分解し、かつ当該相補鎖合成及び分解を少なくとも1回以上繰り返して、生成するピロリン酸又はデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする、前記ポリヌクレオチドの検出方法、並びに当該ポリヌクレオチドの検出方法に用いる検出用キット。

【効果】 遺伝的疾患や感染症の診断に有効な試料中に存在する特定の塩基配列を含むポリヌクレオチドの検出方法及び当該検出方法に使用するポリヌクレオチド検出用キットが提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドに、当該ポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、次いでこれに少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、DNAポリメラーゼ及びヌクレアーゼを加えて、前記プライマーの3'末端に隣接しかつ前記ポリヌクレオチドと相補的である塩基種を相補鎖合成し引き続いて分解し、かつ当該相補鎖合成及び分解を少なくとも1回以上繰り返して、生成するピロリン酸又はデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする、前記ポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項2】 オリゴヌクレオチドプライマーが、当該オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端でホスホロチオエート化されたものであることを特徴とする請求項1記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項3】 DNAポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T4DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ及びPhi29DNAポリメラーゼからなる群から選ばれるDNAポリメラーゼであることを特徴とする請求項1又は2記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項4】 ヌクレアーゼがエクソヌクレアーゼIIIであることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項5】 デオキシヌクレオシドトリリン酸のβ位及びα位のリン酸分子以外の分子又は原子が、放射性同位元素で置換標識されており、かつヌクレアーゼによる反応により生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項6】 ヌクレアーゼによる反応により生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸をクロマトグラフィーによって分離し当該デオキシヌクレオシドモノリン酸を光学的に測定することを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項7】 請求項1～4のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの検出方法において、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成により生成するピロリン酸を、アデノシン-5'-ホスホサルフェート及びアデノシントリリン酸スルフィラーゼと反応させてアデノシントリリン酸を生成させ、当該アデノシントリリン酸を検出することを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項8】 アデノシントリリン酸をルシフェリナーゼ反応によって測定することを特徴とする請求項7記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【請求項9】 以下の1～4の成分：

1. 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性

を有するオリゴヌクレオチドプライマー、

2. DNAポリメラーゼ、

3. 少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、及び

4. 3'→5'方向に2本鎖DNAを分解する活性を有するヌクレアーゼ。

を含む請求項1～8のいずれか1項に記載のポリヌクレオチドの検出方法に使用するポリヌクレオチド検出用キット。

【請求項10】 請求項9記載のポリヌクレオチド検出用キットにおいて、当該検出用キットに、デオキシヌクレオシドモノリン酸検出用試薬を含有させたことを特徴とするポリヌクレオチド検出用キット。

【請求項11】 請求項9記載のポリヌクレオチド検出用キットにおいて、当該検出用キットに、ピロリン酸検出用試薬を含有させたことを特徴とするポリヌクレオチド検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、遺伝的疾患や感染症の診断に有効な試料中に存在する特定の塩基配列を含むポリヌクレオチド（以下、標的ポリヌクレオチドという）の検出方法、及び当該検出方法に使用するポリヌクレオチド検出用キットに関する。

【0002】

【従来の技術】核酸塩基配列の相補性に基づく分析方法は、遺伝的な特徴を直接的に分析することが可能である。そのため、遺伝的疾患、癌化、微生物の識別等には非常に有力な手段である。また遺伝子そのものを検出対象とするために、例えば培養のような時間と手間のかかる操作を省略できる場合もある。

【0003】しかし、検体中に目的の遺伝子量が少ない場合の検出は一般に容易ではなく、標的遺伝子そのものを、あるいは検出シグナル等を増幅することが必要となる。標的遺伝子を増幅する方法の一つとしてPCR(Polymerase Chain Reaction)法が知られている。PCR法は、in vitroにおける核酸の増幅技術として最も一般的な方法である。しかしながら、当該PCR法においては、実施のために特別な温度調節装置が必要なこと；増幅反応が対数的に進むことから定量性に問題があること；試料や反応液が外部からの汚染を受け、誤って混入した核酸が鋳型として機能してしまうコンタミネーションの影響を受け易いこと等の問題点が知られている。

【0004】即ち、PCRのようにDNAを数百万倍にまで増幅させる反応では混入した微量DNAも同様に増幅されるため、誤った結果が提供される傾向がある。これは特に多数の検体を同時に扱う場合には重大な問題である。かかるコンタミネーション対策として、実験室を区別したり、あるいはPCR反応でウラシル基を取り込ませておき、新たにPCR反応を行う前にその検体をウ

ラシルグリコシラーゼ処理し、検体中に誤って混入した他の反応系の増幅産物のみを分解するというような工夫がなされているが、前記対策としては必ずしも十分ではない。

【0005】また、検出シグナルを増幅する方法としてはQ β レプリカーゼでシグナルRNAを増幅する方法(Bio/Technology, 6, 1197-1202(1988), P.M.Lizardi et al.)が報告されている。しかし、この方法は増幅させる配列をレプリカーゼが認識する配列内に挿入する必要があり、その立体構造上の制約から挿入の位置や配列が制限される等の問題がある。またQ β レプリカーゼでシグナルRNAを増幅する方法でもPCR法と同様のコンタミネーションの問題があり、根本的な解決とは言い難い。

【0006】前記の方法は検出対象となる塩基配列を増幅する方法であるが、更に以下に述べるような分解産物を検出するシグナル増幅法も考案されている。例えば、標的核酸にオリゴヌクレオチドプローブDNAをハイブリダイズさせた後、制限酵素処理し、切断されたプローブ断片を検出するシグナル増幅法が知られている(EP-0455517/A1)。この方法は、PCR法に比べて検出感度は低いものの、定量性に優れ、実施に際して特別な装置を必要としない等の利点がある。しかし、この方法ではプローブDNA以外に反応が繰り返し起こるようになるための特異的な配列を持つ第二のオリゴヌクレオチドを系に共存させる必要がある。また検出する部位に制限酵素切断部位が必要であるために検出可能な部位が制限される等の欠点も持つ。

【0007】そのほかに2本鎖DNAを特異的に切断する λ エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法も開発されている(BioTechniques, Vol.13, No.6, 882-892(1992), C.G. Copley et al.)。この方法は、オリゴヌクレオチドプローブが相補的な配列とハイブリダイズして形成された2本鎖DNAに λ エクソヌクレアーゼを作用させ、プローブDNAが2本鎖を維持できない程度まで分解されると新たなプローブDNAと置き替わり、続いてこの新たなプローブも分解されることによりサイクリング反応が起こるというものである。この方法は、当該プローブの分解産物を検出することにより特定のDNA配列の有無を判定することが可能である。また反応原理が単純であり、しかも検出部位の配列が制限されないという点では制限酵素を用いる方法(EP-0455517/A1)よりも有利である。

【0008】しかし、 λ エクソヌクレアーゼは基質として5'末端がリン酸化されたプローブDNAを要求する。DNA合成機を用いてプローブDNAを化学合成した場合5'末端はリン酸化されておらず、そのため合成後改めて末端をリン酸化する必要がある。そして、5'末端が完全にリン酸化されているのかどうかを確認することが難しいためプローブ調製の再現性の点で問題が残

る。更に、 λ エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法はプローブDNAが鋳型DNAに繰り返しハイブリダイズすることが必要であるが、ハイブリダイゼーションの反応は一定温度では起こりにくいため、これが反応系全体における律速となり、サイクリング反応のターンオーバー数が少ないという問題点もある(文献では約500回/時間)。

【0009】エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法としては、特開平5-130870号公報記載の方法も知られている。この公報記載の方法はプライマーを起点とする相補鎖の合成反応とともに5'→3'エクソヌクレアーゼを作用させてプライマーを逆方向から分解する方法である。即ち、5'→3'エクソヌクレアーゼによって分解されたプライマーに代って新たなプライマーがハイブリダイズし、DNAポリメラーゼによって相補鎖の合成と先に合成された鎖を外す反応が進行しサイクリング反応が成立する。当該方法においては、PCR反応のような複雑な温度制御は要求されないが、プライマーのハイブリダイズ工程を繰り返す必要があるのではなりターンオーバー数(プローブDNAのハイブリダイゼーションの繰り返し数)を上げにくいという問題が残る。

【0010】本発明者等は、これらの問題点の解消を目的として、特定の反応促進剤をエクソヌクレアーゼIIIとともに用いる塩基配列検出方法を開発した(特開平6-327499号公報)。この方法はプローブの合成が容易な上、反応時には特殊な温度制御が不要となり、しかもコンタミネーションの影響を殆ど受けずに塩基配列を検出することが可能となる優れた方法である。しかし、この技術では反応促進剤は、ターンオーバー数(λ エクソヌクレアーゼを用いたサイクリングアッセイ法での説明と同様のプローブDNAのハイブリダイゼーションの繰り返し数)を増加させる効果は認められるものの、プローブDNAが繰り返しハイブリダイズしなければならないことには変わりはなく、必ずしも高感度を得られないという問題点を残していた。

【0011】加えて今まで述べた遺伝子の増幅法においては、プライマーとして加えたオリゴヌクレオチドは増幅産物となってプライマーとしては機能しなくなるので、予め予想される検出対象量に対して大過剰量のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用意しなければならない。特にPCR法のように対数的に増幅産物が生成する系では、非常に多量のオリゴヌクレオチドを用意する必要があった。オリゴヌクレオチドプライマーは化学的に合成するにしろ、生物材料に原料を求めるにしろ試薬成分のコストの点から使用量は少ない方が好ましい。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、特殊な装置が要求される複雑な温度制御によらず、単純な反応系でコンタミネーションの影響を受け難い塩基配列の検出技

術の提供を課題とする。また本発明は、これらの目的を達成するために検出対象となる塩基配列の制限のない、汎用性に優れる検出技術の提供をも課題とするものである。更に、検出系の選択によっては高い感度と定量性を得ることが可能な塩基配列の検出技術の提供をも課題とするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、前記課題の解決を目的として鋭意検討を行った。その結果、一本鎖DNAには作用せず二本鎖となったDNAのみを切断し、かつ塩基配列には限定されないヌクレアーゼをDNAポリメラーゼとともに利用したシグナル増幅法を開発し、本発明を完成した。

【0014】即ち、本発明は以下の事項をその要旨とするものである。

(1) 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドに、当該ポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせ、次いでこれに少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、DNAポリメラーゼ及びヌクレアーゼを加えて、前記プライマーの3'末端に隣接しかつ前記ポリヌクレオチドと相補的である塩基種を相補鎖合成し引き続いて分解し、かつ当該相補鎖合成及び分解を少なくとも1回以上繰り返して、生成するピロリン酸又はデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする、前記ポリヌクレオチドの検出方法。

【0015】(2)オリゴヌクレオチドプライマーが、当該オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端でホスホチオエート化されたものであることを特徴とする前記(1)記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0016】(3)DNAポリメラーゼが、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T4DNAポリメラーゼ、T7DNAポリメラーゼ及びPhi29DNAポリメラーゼからなる群から選ばれるDNAポリメラーゼであることを特徴とする前記(1)又は(2)記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0017】(4)ヌクレアーゼがエクソヌクレアーゼIIIであることを特徴とする前記(1)～(3)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0018】(5)デオキシヌクレオシドトリリン酸のβ位及びγ位のリン酸分子以外の分子又は原子が、放射性同位元素で置換標識されており、かつヌクレアーゼによる反応により生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする前記(1)～(4)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0019】(6)ヌクレアーゼによる反応により生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸をクロマトグラフィーによって分離し当該デオキシヌクレオシドモノリン酸を光学的に測定することを特徴とする前記(1)～(4)の

いずれかに記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0020】(7)前記(1)～(4)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの検出方法において、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成により生成するピロリン酸を、アデノシン-5'-ホスホサルフェート及びアデノシントリリン酸スルフリラーゼと反応させてアデノシントリリン酸を生成させ、当該アデノシントリリン酸を検出することを特徴とするポリヌクレオチドの検出方法。

【0021】(8)アデノシントリリン酸をルシフェリン-ルシフェラーゼ反応によって測定することを特徴とする前記(7)記載のポリヌクレオチドの検出方法。

【0022】(9)以下の1～4の成分：

1. 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマー、
2. DNAポリメラーゼ、
3. 少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、及び
4. 3'→5'方向に2本鎖DNAを分解する活性を有するヌクレアーゼ。を含む前記(1)～(8)のいずれかに記載のポリヌクレオチドの検出方法に使用するポリヌクレオチド検出用キット。

【0023】(10)前記(9)記載のポリヌクレオチド検出用キットにおいて、当該検出用キットに、デオキシヌクレオシドモノリン酸検出用試薬を含有させたことを特徴とするポリヌクレオチド検出用キット。

【0024】(11)前記(9)記載のポリヌクレオチド検出用キットにおいて、当該検出用キットに、ピロリン酸検出用試薬を含有させたことを特徴とするポリヌクレオチド検出用キット。

【0025】以下、本発明について詳細に説明する。

A. 本発明の検出対象は、その塩基配列が既知のポリヌクレオチドである。本発明の検出対象は、動物、植物、細菌、酵母、糸状菌、マイコプラズマ、リケッチア、ウイルス他あらゆるものに由来するポリヌクレオチドにおよぶ。またポリヌクレオチドとしては、ゲノミック核酸はもちろん、RNAウイルスやmRNAから誘導されたcDNAを検出対象とすることも可能である。なお実際に検体を分析するときには、検体に含まれる検出対象以外のDNAの配列や、DNA合成のプライマーとなりうる配列の存在が問題となることがある。また、DNAポリメラーゼやヌクレアーゼの活性阻害物質、デオキシヌクレオシドトリリン酸も混入している可能性もある。更にピロリン酸を検出対象とする場合には、検体中に共存するピロリン酸も分析を妨害する要因となる。

【0026】従って、本発明においては増幅反応を行うためには可能な限り前記混入物を除去することが好ましい。例えば、固相に結合した捕捉プローブ等を用いて標的DNAを捕捉し、続いて洗浄により前記不純物を除去し、その後本発明を適用するとバックグラウンドのない

高感度の検出系が可能となる。このとき捕捉プローブを5'末端で固相と結合しておけば(Eur. J. Immunol., 23, 1895-1901(1993), H. Kohsaka et al.; Nucleic Acid Research, 21, 3469-3472 (1993), H. Kohsaka et al.), 捕捉プローブそのものをプライマーとして本実験の方法を適用することも可能となる。なお、前記ピロリン酸の除去についてはピロホスファターゼによる酵素的な除去も可能である。

【0027】また、特に1塩基の伸長～分解を1サイクルとして繰り返す、本発明の好ましい方法においては、後述するように点突然変異の検出に応用することができる。なお、点突然変異の検出方法として、特開昭59-208465号公報記載の方法が既に知られている。この方法は、プライマーに続く相補配列の合成反応において基質としてヌクレオチドの誘導体を用いることによって点突然変異が存在する場合(又は存在しない場合)に限りこのヌクレオチド誘導体を取り込まれるという反応原理に基づく方法である。即ち、基質としてヌクレオチド誘導体を取り込んだ場合には反応産物がエクソヌクレアーゼに対する耐性を獲得するので、当該ヌクレアーゼによるヌクレオチドの分解の有無を特定することによって点突然変異を検出することができる。

【0028】確かに、前記方法で用いられている要素の一部は本発明と共通するものである。しかしながら、そもそも前記方法がヌクレアーゼ耐性獲得の有無を点突然変異が存在する指標とすることを特徴とする方法であるのに対し、本発明は反応が繰り返し起きるかどうかを点突然変異の存在の指標として用いるものであるという点において本質的に異なる。そして、本発明方法による点突然変異の検出は、前記方法による当該変異の検出に比べても感度の点で良好であり有利である。

【0029】B. 本発明は、前記の既知のポリヌクレオチドに、当該ポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせることを特徴とする。本発明において、「相補的」とは、塩基配列が塩基対のワトソン・クリック則に従って、もう一方の核酸と水素結合による二重鎖を形成し得る状態のことをいう。具体的には、アデニン(A)に対してはチミン(T); グアニン(G)に対してはシトシン(C)が対応する相補性を有する状態である。なお、本発明に用いるプライマーは、標的となるポリヌクレオチドの塩基配列に対して完全に相補的である必要はなく、少なくとも当該オリゴヌクレオチドが全体として前記標的ポリヌクレオチドに対してハイブリダイズすることが可能であれば足りる。具体的には、オリゴヌクレオチドの3'末端の塩基が標的ポリヌクレオチドの塩基と対応することを必須として、オリゴヌクレオチドの塩基全体の少なくとも70%が前記の相補性を標的ポリヌクレオチドとの関係において有することが必要である。かかる相補性が70%未満になると

前記ハイブリダイズ自体が困難になるため好ましくない。一方、3'末端の塩基が標的ポリヌクレオチドの塩基と対応するという条件は、本発明が3'末端において塩基の付加反応を行うための必須の条件である。3'末端で塩基が対応せずプライマーが1本鎖となっていると、ポリメラーゼやヌクレアーゼが認識できなくなってしまう。

【0030】また、本発明に用いるオリゴヌクレオチドプライマーは、既知の標的ポリヌクレオチドの「一部」と相補的であることを特徴とする。これは、本発明方法が、オリゴヌクレオチドプライマーの3'末端側にDNAポリメラーゼによって付加される予め反応系に存在させた特定のデオキシヌクレオチドを検出することを特徴とすることに起因する。即ち、プライマーの3'末端側に付加されるデオキシヌクレオチドに対して鋳型となるヌクレオチドが既知でなければ、予め特定のデオキシヌクレオチドを系内に存在させることが困難である故に、本発明に用いるオリゴヌクレオチドプライマーは、既知の標的ポリヌクレオチドの「一部」と相補的であることが必要となる。

【0031】また、本発明に用いるオリゴヌクレオチドプライマーは、ヌクレアーゼに対して耐性を有することが必要である。これは、本発明においては、系内にヌクレアーゼを存在させることが必要であるため、かかるヌクレアーゼによりオリゴヌクレオチドプライマーが分解されてしまえば本発明方法を実施することが困難になるからである。オリゴヌクレオチドプライマーにヌクレアーゼ耐性を付与する方法は特に限定されるものではなく、この分野において通常用いられる方法をいずれも利用することができる。

【0032】具体的には、例えばDNA合成装置でプライマーとなるオリゴヌクレオチドを合成するときに公知の方法によって必要な部位にホスホロチオエート(Phosphorothioate)結合を導入すればオリゴヌクレオチドプライマーにヌクレアーゼ耐性を与えることができる。このような方法としては、例えば固相ホスホロアミダイト(Phosphoramidite)法でDNAを合成する場合であれば、ヨウ素水等による酸化工程に代えて適当なS化試薬(ホスホロチオエート化試薬)によって酸化処理を行うことで通常のリン酸ジエステル結合ではなくホスホロチオエート結合をオリゴヌクレオチドに導入することができる。S化試薬としては、3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxide(Beaucage's Reagent)、TETD/Acetonitrile(TETD:tetraethylthiuram disulfide)等が知られている。この方法によれば、ホスホロチオエート結合をオリゴヌクレオチドの任意の部位に導入することができる。

【0033】あるいは、DNAポリメラーゼによってDNAを合成する際に、デオキシリボヌクレオシドトリリン酸のα位のリン原子に結合した酸素を硫黄に置換したものを基質として用いることによってオリゴヌクレオチ

ドにホスホロチオエート結合を導入することができる。このような置換化合物としては、 α -S-デオキシチミジントリリン酸、 α -S-デオキシシトシントリリン酸、 α -S-デオキシアデントリリン酸及び α -S-デオキシグアニントリリン酸等（これらの置換化合物を総称してS d X T Pと省略する）を例示することができる。DNAポリメラーゼによる合成反応を行うときに、デオキシヌクレオシドトリリン酸（以下、d X T Pと省略する）に代えてS d X T Pを基質とすることにより、合成されたオリゴヌクレオチドはホスホロチオエート化され、ヌクレアーゼ耐性を獲得する。DNAポリメラーゼによってホスホロチオエート結合を導入する場合は、実際に検出対象であるポリヌクレオチドにハイブリダイズした状態でこの反応を進行させることができる。つまり、本発明におけるヌクレアーゼ耐性オリゴヌクレオチドプライマーは、必ずしも予め準備されている必要はなく反応時にヌクレアーゼ耐性を獲得する方法を採ることも可能である。

【0034】一旦ヌクレアーゼ耐性とすれば以降の反応を後述する反応原理に従って進行させることができる。なお、この場合はまずS d X T Pが付加し、次いでd X T Pが付加し、少なくとも2塩基分の伸長反応が必要になるが、2つめのd X T Pに対してはヌクレアーゼが作用するので本発明方法を実施することができる。いずれにしても、プライマーの3'末端付近のホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合とすることによって、3'側から攻撃するヌクレアーゼに耐性を示すオリゴヌクレオチドプライマーとなる。ただし、オリゴヌクレオチド全体をホスホロチオエート結合とすればヌクレアーゼ耐性度は更に上昇するが、同時にハイブリダイズする効率が低下することになる。従ってホスホロチオエート結合の数は、末端から1~数個とすることが好ましい。ホスホロチオエート結合は末端の1個のみでもよいが、数個分、好ましくは3個分を連続してホスホロチオエート結合とすれば、より完全なヌクレアーゼ耐性を期待できる。

【0035】ただし、前記のようにDNAポリメラーゼによるDNAへの取り込みの効率はS d X T Pがd X T Pよりかなり低いので、始めにS d X T Pを取り込ませた後に分解用のd X T Pを加えるか、あるいはS d X T P濃度を高めに設定しておくといった工夫が必要な場合もある。

【0036】ヌクレアーゼ耐性の付与手段としては、前記ホスホロチオエート化の他に、メチルホスホネート(Methylphosphonate)結合、ホスホロアミデート(Phosphoramidate)結合、ポリアミド核酸(Polyamide nucleic acid(PNA))結合等の導入を示すことができる。これらの結合によってヌクレオチドのリン酸結合部位、リボース部位、そして核酸の塩基部位が修飾、あるいは構造をモディファイされてヌクレアーゼ耐性を獲得する。

【0037】この他に、オリゴヌクレオチドプライマーとしてRNAプライマーを用いることも可能である。RNAはDNAに作用するヌクレアーゼに対してほぼ耐性を有するものである。従って、RNAプライマーを用いれば、特別な修飾を施さなくてもDNAに作用するヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマーを用意することが可能である。ただし、DNAに作用するヌクレアーゼやDNAポリメラーゼの中にはRNase H活性を併せ持つものも存在し、このような場合にはRNAプライマー自身が分解されるため酵素の組み合わせによっては高感度を得にくい場合もある。

【0038】本発明におけるオリゴヌクレオチドプライマーは、塩基数で少なくとも6以上、好ましくは10~50、特に好ましくは15~30程度とする。6未満では通常の条件ではハイブリダイズしにくいばかりでなく、確率的にも非特異的な反応につながる可能性が増す。他方例えばホスホロチオエート化することによってヌクレアーゼ耐性としたオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型に対する親和性(Tm)が低下するので、この低下分を補うためにもある程度の長さを与えることが必要になる。これに対して30を越えると化学的に合成する時に収率が低下し易くなるので経済的に不利であるので好ましくない。更に、必要以上に長いプライマーを用いる場合はプライマー間、あるいはプライマー内の水素結合による2本鎖が形成されやすくなり非特異的な反応が起こりやすくなる。このように不必要に長いプライマーは、非特異増幅等の原因となる場合があるので好ましくない。

【0039】なお、本発明に使用し得るDNAポリメラーゼは後述するが、その中にはDNAポリメラーゼIのように弱いながら2本鎖DNAに対する5'→3'エクソヌクレアーゼ活性を有するものも存在する。この種の酵素をDNAポリメラーゼとして用いる時にはハイブリダイズしたプローブが5'側からの分解を受けるので5'側もヌクレアーゼ耐性としておくとよい。なお、同じDNAポリメラーゼでもクレノウフラグメントやPhi 29 DNAポリメラーゼはこの活性を有しないので5'側は特に修飾する必要がなく、この点においては好ましい。

【0040】オリゴヌクレオチドプライマーの使用量は、検出対象となる塩基配列に対して十分量となるように添加する。従来の塩基配列の増幅法では、プライマーとして加えたオリゴヌクレオチドが増幅産物となってプライマーとしては機能しなくなるので鋳型となる塩基配列の量に対して大過剰量で用いる必要があったが、本発明では1度ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーが繰り返しプライマーとして機能するため少なくとも鋳型となる塩基配列と等モル存在すれば定量的な反応が可能となる。実際には、平衡状態をハイブリダイズする方に傾けるために十分量のオリゴヌクレオチドプライマーを利用するのが好ましい。検出対象となる標的配

列の量をあらかじめ予想することは困難であるが、少なくとも希望する検出範囲の量に対して等モルを越える量を、好ましくは5倍以上の過剰量でオリゴヌクレオチドプライマーを用いることが高い感度を確保するうえで好ましい条件となる。

【0041】ハイブリダイズの条件は特に限定されないが、ハイブリダイズ後はDNAポリメラーゼとヌクレアーゼの存在下で全ての反応を進行させる必要があることに着目する必要がある。特にヌクレアーゼはPCR法で用いられるTaqポリメラーゼのような高度の耐熱性を持たないので、当該ヌクレアーゼの酵素活性を維持できる条件を採用する必要がある。また温度以外の要素である緩衝液の選択やpHの設定等も、ハイブリダイズのみならずヌクレアーゼの活性が十分に発現できる条件を選択すべきである。具体的な条件を例示すれば、緩衝液としてトリス-塩酸緩衝液等を用いたとき、pHは約7～9とし、20～55℃で反応を行わせる。特に好ましい条件としては、pH7.5～8.5、温度は30～45℃を示すことができる。

【0042】例えば、実施例に示したように、0.1pmolのプライマー、50mMのTris/HCl緩衝液(pH7.5)、10mM MgCl₂のみからなる溶液中で加熱処理(100℃で5分間)後、65℃で10分間アニーリングする。この場合は、すぐに37℃でDNAポリメラーゼ反応及びヌクレアーゼ反応を進行させることが可能である。なお、最終的に反応系に蓄積されるピロリン酸を酵素的に測定する場合には、この酵素反応についても好適な反応条件が提供されなければならない。即ちpH、塩濃度、温度等を酵素反応に適するように設定する。

*

*【0043】また、反応液中にDNAポリメラーゼやヌクレアーゼの安定化剤を添加することができる。かかる安定化剤としては、例えば牛血清アルブミン(BSA)、ジチオスレイトール(DTT)、β-メルカプトエタノール等を挙げることができる。かかる安定化剤の添加量は、BSAは10～500 μg/ml、DTTは1mM程度、β-メルカプトエタノールは10mM程度である。検出対象となるポリヌクレオチドが二本鎖状態である場合には、予め一本鎖に変性する必要がある。かかる変性方法としては、通常公知の変性方法、例えば加熱変性、酸変性、アルカリ変性等を挙げることができるが、方法の簡便性と確実性に鑑みれば、加熱変性(90℃～100℃で5分以上加熱)を採用するのが好ましい。

【0044】また、目的としたプライマー以外のDNAのハイブリダイズを抑制するか、又は非特異的にハイブリダイズしたDNAを除去して非特異的な反応を抑制するために、DNAポリメラーゼ添加前にあらかじめエクソヌクレアーゼ処理を行うこともできる。

【0045】C. 本発明は、次いで、前記ハイブリダイズの後、系に少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、DNAポリメラーゼ及びヌクレアーゼを加えて、前記プライマーの3'末端に隣接しかつ前記ポリヌクレオチドと相補的である塩基種を相補鎖合成し引き続いて分解し、かつ当該相補鎖合成及び分解を少なくとも1回以上繰り返すことを特徴とする。以下に本発明の反応原理を示す。本発明の反応原理を図1及び下記式1に示す。

【0046】

【化1】

13

14

(式1)

オリゴヌクレオチドプライマー(3' 端のT-C 間がヌクレオチド結合しているため、ヌクレアーゼ耐性となっている)がハイブリダイズする

検出対象の一本鎖DNA(上段)

5' - . . . CCGGAAGTCTTGATAAGATAGGGGCATTAGG . . .
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

オリゴヌクレオチドプライマー(下段)

↓

DNAポリメラーゼの作用でプライマーの3' 末端にC(※で表示)が一つ伸長し、同時にP P i分子が生成する

5' - . . . CCGGAAGTCTTGATAAGATAGGGGCATTAGG . . .
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

※

↓

P P iが生成

ヌクレアーゼの作用でDNAポリメラーゼにより付加されたCが分解し、d C M Pが生成する

5' - . . . CCGGAAGTCTTGATAAGATAGGGGCATTAGG . . .
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

※

↓

分解産物(d C M P)

↓

再びDNAポリメラーゼの作用でプライマーの3' 末端にCが一つ伸長

5' - . . . CCGGAAGTCTTGATAAGATAGGGGCATTAGG . . .
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

※

↓

P P iが生成

↓

繰り返し

【0047】まず、検出対象となる1本鎖の核酸にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーをもとにDNAポリメラーゼの作用によって相補鎖の合成がスタートする。このときに1分子のd X T Pの付加にともない1分子のピロリン酸(以下P P iと省略することもある)が生成する。一方、この状態で2本鎖のDNAの3' 末端から分解していくヌクレアーゼを作用させると、伸長した部分を分解する反応が進行する。しかしオリゴヌクレオチドプライマーはヌクレアーゼ耐性であるためプライマー部分は分解されないでそのまま残り、再度DNAポリメラーゼによる伸長反応の起点となる。このように繰り返し反応が起ることによって反応系にはピロリン酸、あるいはヌクレアーゼの分解によって生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸が蓄積していく。

【0048】なお前述したように、前記反応時にDNAポリメラーゼの作用により、オリゴヌクレオチドプライマーをヌクレアーゼ耐性として前記工程に付することも*

30 *可能である。このピロリン酸か、又はヌクレアーゼによる分解によって生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することによって検出対象となる塩基配列の有無を検出又は定量することが可能となる。

【0049】更に、本発明の検出方法によって点突然変異を検出する系を構成することが可能である。即ち、予め点突然変異の起る部位がわかっている場合に、当該部位の5' 側に隣接する領域に相補な配列をオリゴヌクレオチドプライマーとして利用する。伸長する鎖の基質となるd X T Pとして、正常な配列のときのみ伸長が起るように1種の基質のみ加えておけば、点突然変異がおきている場合には伸長できないので反応が停止する。このようにして点突然変異の有無を容易に確認することが可能となる(下記式2)。

【0050】

【化2】

まず、オリゴヌクレオチドプライマー(3' 端のT-C 間がホスホロチオエート結合しているため、ヌクレアーゼ耐性となっている)がハイブリダイズする

検出対象の一本鎖DNA (上段)

5' - - - CCGGAAGTGTTCGATAAGATAGGGCATTAGG - - -
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

オリゴヌクレオチドプライマー (下段)

↓

正常であればDNAポリメラーゼの作用でプライマーの3' 末端にC(※で表示)が一つ伸長し反応が進行する

5' - - - CCGGAAGTGTTCGATAAGATAGGGCATTAGG - - -
CCTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

↓

一方、点突然変異によってGが他の塩基となっているならば(仮にAとした)、Aに対して相補的な塩基はTであるため、基質としてはdCTPが用意されているのみであるために反応はこれ以降は進まない

5' - - - CCAGAAGTGTTCGATAAGATAGGGCATTAGG - - -
CTTCACAACCTATTCTATCCCCGTAA - 5'

↓

【0051】またオリゴヌクレオチドプライマーがハイブリダイズすべき領域に変異が起れば、当然のことながらハイブリダイズの効率が低下するので反応全体が進行しにくくなり、これにより点突然変異の有無を知ることができる。前記において使用するDNAポリメラーゼは、鋳型となる1本鎖の核酸に相補鎖がハイブリダイズして構成された2本鎖部分を起点として5' → 3' 方向に相補鎖を伸長する反応を触媒するDNAポリメラーゼを用いる。実際には現在知られているDNAポリメラーゼは、全て5' → 3' 方向へのDNA合成酵素活性を持つ。また、DNA合成が起こるには必ずプライマーが必要であり、プライマーが存在しない場合やハイブリダイズできない場合にはDNAの合成は起こり得ない。これが、本発明がプライマーと鋳型鎖に依存して特異性が高くなる理由の一つである。具体的に本発明において用いるDNAポリメラーゼとしては、DNAポリメラーゼI、DNAポリメラーゼIのクレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ、T7 DNAポリメラーゼ、Phi 29 DNAポリメラーゼ等又はこれらのDNAポリメラーゼの変異体を挙げることができる。

【0052】なお、DNAポリメラーゼとしてT4 DNAポリメラーゼやT7 DNAポリメラーゼのように強力な3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性を併せ持つものを用いれば、別途添加するヌクレアーゼ量を節約することが可能であり、又は核酸に作用する酵素として1種の強力な3' → 5' エクソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼのみを加えることで本発明の反応系を構成することも可能である。ただし、これらのDNAポリメラーゼはヌクレアーゼ耐性であるホスホロチオエート結

合もある程度分解するので、高感度を期待できない場合もあり得る。故に、この場合はプライマーの末端付近のホスホジエステル結合を、複数の結合に互って修飾するか、あるいはホスホロチオエート化以外の修飾によってヌクレアーゼ耐性とすることが望ましい。

【0053】前記において使用するヌクレアーゼは、2本鎖のDNAを3' → 5' 方向に分解する活性を持つヌクレアーゼである。このようなヌクレアーゼとしては、エクソヌクレアーゼIIIが知られている。エクソヌクレアーゼIIIとしては現在のところ大腸菌由来のものが市販されているが、これに限定されるものではなく他の微生物やあるいは遺伝子組み換えによって得られたものであっても利用することができる。エクソヌクレアーゼIIを用いた場合には、DNAポリメラーゼとして例示したDNAポリメラーゼI、そのクレノウフラグメント、T4 DNAポリメラーゼ等とほぼ同じ反応条件で酵素活性を示すため、DNAポリメラーゼによる反応と平行して同一の反応液中で同時に反応を進行させることができる。エクソヌクレアーゼIIIは、2本鎖DNAを3' → 5' 方向に特異的に分解すること、1本鎖DNAには作用しないので検出対象である配列やプライマーは攻撃されない、SdXTPによりプライマーを簡単にヌクレアーゼ耐性にすることができる、等の特徴から本発明の反応サイクルの循環に非常に好適な酵素である。

【0054】DNAポリメラーゼによるオリゴヌクレオチドプライマーを起点とするDNAの伸長反応の基質には、デオキシヌクレオシドトリリン酸(dXTP)を用いる。そして、本発明においては予め配列の明らかな部分について少なくとも1塩基分が伸長すれば分析が可能

となるので、少なくともこの1塩基分に対応する1種のヌクレオチドのみを用いることで所望の反応を進行させることができる。当該基質濃度は、検出対象となる塩基配列のモル数に対して十分量となるように添加する。一般的には検出対象の量を正確に予測することは困難なので、少なくとも0.1 μM 、好ましくは1 μM 以上のヌクレオチドを添加しておけば、ほとんどの場合は基質が不足する事態を避けることができる。

【0055】D. 本発明は、生成するピロリン酸又はデオキシヌクレオシドモノリン酸を検出することを特徴とする。

①生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸の検出
本発明方法では、ヌクレアーゼによるヌクレオチド鎖の分解反応により生成するデオキシヌクレオシドモノリン酸（以下、dXMPと記載する）を検出することで、即ちDNAポリメラーゼによる伸長反応によって付加したdXTPに対応するdXMPを検知することによって、所望のポリヌクレオチドを検出することができる。

【0056】基質として用いるdXTPの α 位のリン原子を放射性同位元素（ ^{32}P 又は ^{33}P ）で置換標識することにより； α 位のリン酸の、デオキシリボースの、若しくは塩基の水素原子を ^3H で置換標識することにより；又はデオキシリボースの炭素原子を ^{14}C で標識することにより、dXTPとdXMPとをイオン交換樹脂などでクロマト的に分離して放射活性を追跡することによって分解産物であるdXMPの放射活性を測定することが可能である。なお、現在 α 位のリン原子が ^{32}P 標識したdXTPとしては、dATP、dCTP、dGTP及びdTTPが市販されている。また、現在 α 位のリン原子が ^{33}P 標識したdXTPとしては、dATP及びdCTPが市販されている。また、塩基部分を ^3H 標識したものとしては、dATP、dCTP、dGTP及びdTTP*
(式3)

*が市販されている。

【0057】ラジオアイソトープ標識を持つdXMPは、イオン交換樹脂を用いた薄層クロマトグラフィーで分離すれば放射活性をオートラジオグラフィーによって簡便に、かつ定性的に検出することができる。また、実施例に示すようにこの放射活性を有するスポットを削り取ってシンチレーションカウンターで計数すれば、定量的な分析も可能である。更に必ずしもアイソトープで標識した基質を用いなくとも次のような操作によればdXMPの分離、測定が可能である。即ち、反応液を市販の蛍光色素を塗布した薄層クロマトグラフィーによって分離し、これに紫外線を照射すればヌクレオチドが紫外線を吸収するため、非蛍光スポットとしてdXMPを視認することができる。また、液体クロマトグラフィーによって分離し紫外線吸収を計測すればdXMPを定量的に検出することができる。

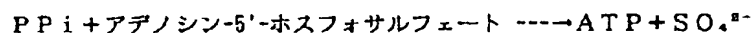
【0058】②DNAポリメラーゼによる鎖伸長反応により生ずるピロリン酸の定量

本発明方法では、DNAポリメラーゼによるdXMPの付加にともなうPPiの生成を測定することにより、所望のポリヌクレオチドを検出することができる。このDNAポリメラーゼによるdXMPの付加にともない生成するPPiを追跡する方法によれば、酵素的に測定することが可能なおうえ、反応液をクロマトグラフィー等で分離する作業も省略できるため非常に簡便な方法となる。具体的には、下記式3の反応等が知られている。当該式3の反応（J. Immunological Methods, 156, 55-60 (1992), T. Tabary et al.）では、高感度な測定が可能となるうえ、均一系で分析できるため操作も簡単である。

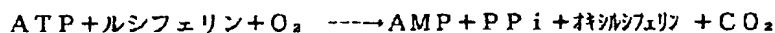
【0059】

【化3】

ATPスルフィラーゼ



ルシフェラーゼ



発光

【0060】この他のピロリン酸の測定法としては、「Anal. Biochem., 94, 117-120 (1979)」に引用された方法等が知られている。

【0061】E. 具体例

以下に具体的なオリゴヌクレオチドプライマーの配列と※

※その配列を用いた場合の本発明による反応系を例示する（下記式4）。

【0062】

【化4】

19

20

(式4)

CMVゲノムDNAのDフラグメント中、CMVに特異的な配列

5'-TTGTCCCGAA ATGAT →ATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG ← CACGTGCTGA-3'

5'-TTGTCCCGAA ATGATATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG CACGTGCTGA CMV
TAGGC ATGACCCAGG GTAAAGCCCC -5' プライマー

↓

DNAポリメラーゼの作用でAが1つ伸長（*で示した）し、PPiが生成

5'-TTGTCCCGAA ATGATATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG CACGTGCTGA CMV
ATAGGC ATGACCCAGG GTAAAGCCCC -5' プライマー

* + PPi

↓

ヌクレアーゼで分解され分解産物（dAMP）が生成して*の位置が空く

↓

5'-TTGTCCCGAA ATGATATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG CACGTGCTGA CMV
*TAGGC ATGACCCAGG GTAAAGCCCC -5' プライマー

↓

再びDNAポリメラーゼの作用でAが1つ伸長

5'-TTGTCCCGAA ATGATATCCG TACTGGGTCC CATTTCGGGG CACGTGCTGA CMV
ATAGGC ATGACCCAGG GTAAAGCCCC -5' プライマー

↓

繰り返す

【0063】①ヒトサイトメガロウイルス（以下CMVと省略する）の検出を例にとると、CMVゲノムDNA 30中の制限酵素EcoRI 切断断片のDフラグメントに由来し、CMVゲノムに特異的な配列をプライマーとする。具体的な配列は式4に示したとおりである。式4に示す配列のどの部分を用いても良いが、以下の説明では式4中の→←で挟まれた部分にハイブリダイズする相補鎖をプライマーとする（配列番号1）。3'側のA-Tの間のホスホジエステル結合をホスホロチオエート結合とする。PPi又は分解産物であるdAMPを測定することにより、CMV配列が検体中に存在するか否かを知ることができる。

【0064】②特に1塩基の伸長～分解を1サイクルとして繰り返す、本発明の好ましい方法では、先に述べたように点突然変異の検出に応用することができる。以下に点突然変異の検出例としてヒト癌遺伝子K i - r a s / 1 2の検出系を示す。K i - r a s / 1 2には、下記式5に示されるような変異体が知られている（下記式5中でドットで示したのは異常の生じていない正常な配列部分である）。

【0065】

【化5】

(式5)

| → プライマー ← |

正常な配列：5'- AATATAAACT TGTGTTAGTT GGAGCTGGTG GCGTAGGCAA
TTATATTGA ACACCATCAA CCTCGACCAC CGCATCCGTT

変異体 5'-T.....
.....A.....

【0066】プライマーとしては式5中に示した部分の配列（配列番号2）を用いる。なお3'側のT-G間をホスホロチオエート結合としヌクレアーゼ耐性としておき、DNAポリメラーゼによる合成用の基質としてはdGTPのみを加えておく。この例では、検出対象が正常であればdGTPを取りこむ反応が進行し、PPiとdGMPが蓄積される。しかし、検出対象が変異体である場合には、相補鎖の合成に必要なdTTPがないため反応が進行しない。逆にdTTPのみを基質に加えた時に反応が進行すれば、検出対象となった配列には点突然変異が含まれていることがわかる。本発明ではこのようにして点突然変異を検出することが可能である（下記式6

参照)。

【0067】

【化6】

(式6)

dGTP

正常な配列であればdGTPが取り込まれるはず！

ATAAACT TGTGGTAGTT CGAGCTG 3'
TTATATTGA ACACCATCAA CCTCGACCAC CGCATCCGT

【0068】なお、式5及び式6ではプライマーが上段に、鋳型配列が下段に表示されており、前記式1、2及び4(鋳型配列が上段で、プライマーが下段)とは表示が異なっている。

【0069】F. 本発明ポリヌクレオチド検出用キット以上のような本発明に必要な各種成分は、予め組み合わせた試薬の形で供給することができる。あらためて本発明による塩基配列検出用試薬の構成を次に示す。以下に示す試薬には、更に標識の検出に必要な資材や反応液を構成する緩衝剤、あるいは陰性や陽性の対照等の任意の成分を組み合わせてキットの形とすることもできる。

【0070】本発明ポリヌクレオチド検出用キットの構成は以下のごとくである。

1. 検出対象のその塩基配列が既知であるポリヌクレオチドの一部と相補的な配列を有しかつヌクレアーゼ耐性を有するオリゴヌクレオチドプライマー、
2. DNAポリメラーゼ、
3. 少なくとも1種のデオキシヌクレオシドトリリン酸、
4. 3' → 5' 方向に2本鎖DNAを分解する活性を有するヌクレアーゼ。

【0071】以上1~4を含むキットに、前記のポリヌクレオチドの検出の指標に応じて、検出用試薬を含ませることができる。即ち、dXMPの検出を企図する場合には、デオキシヌクレオシドモノリン酸検出用試薬を含有させることができる。かかる検出用キットの具体例としては、例えば以下に挙げる検出用キットを挙げることができる。

【0072】即ち、反応用試薬として、ホスホロチオエート化オリゴヌクレオチド、DNAポリメラーゼI、クレノウフラグメント、デオキシヌクレオシドトリリン酸(³²P標識)、エクソヌクレアーゼIII、Tris/HCl緩衝液、MgCl₂、BSA及びDTTを含み；反応停止液としてEDTAを含み；dXMP検出用試薬として、薄層クロマトグラフィー用イオン交換セルロース(PEI=ポリエチレンジアミンセルロース)及びLiCl(展開溶媒)、又はピロリン酸検出用試薬として、ATPスルフィラーゼ、アデノシン-5'-ホスホサルフェート、ルシフェリン及びルシフェラーゼを含む検出用キットを挙げることができる。

【0073】以下に、本発明の作用機序と実際上の効果

を集約して記載する。本発明におけるオリゴヌクレオチドプライマーは、検出対象となる塩基配列に特異的にハイブリダイズしDNAポリメラーゼによる伸長反応の起点となる。また予めヌクレアーゼ耐性としておくか、あるいはDNAポリメラーゼの作用でデオキシヌクレオチド誘導体(SdXTP等)を付加してヌクレアーゼ耐性とすることによって、以下に続くDNAポリメラーゼの作用によるデオキシヌクレオシドトリリン酸(dXTP)の付加~ヌクレアーゼの作用による分解という2つの反応を繰り返し起こすことを可能とする。この反応が繰り返し直線的に起きるので、本発明においてはヌクレアーゼ分解産物が反応系に蓄積し、定量的でしかも高感度な検出系が実現できる。

【0074】そして、プライマーがミスマッチにより非特異的な配列にハイブリダイズしたとしても、それに隣接する領域の相補鎖を合成していく工程において予め基質として用意したdXTPが適合していなければ以降の反応が進まず誤った結果は生じないという利点を有する。また、本発明では高温処理によるDNAの変性操作を繰り返す必要がないのでDNAポリメラーゼをはじめとする試薬成分には熱安定性が要求されず、しかも複雑な温度制御を必要としない。そのため、操作を自動化することが容易であるという利点をも有する。

【0075】本発明におけるDNAポリメラーゼは、前記プライマーがハイブリダイズした領域に隣接する配列に対して相補な鎖を合成するものである。合成時には、1モルのdXTPの付加反応について1モルのPPiを生成する。PPiは酵素反応により特異的に測定することができるので、本発明においては合成反応によって同時に信号を生成するシステムとなっている。また、別の実施態様においては、この反応で伸長した部分がヌクレアーゼによって分解された産物を検出対象とすることができる。DNAポリメラーゼは、オリゴヌクレオチドプライマーとしてヌクレアーゼ耐性でないものを利用するときにデオキシヌクレオチド誘導体を基質とすることによってこれをヌクレアーゼ耐性に変換する作用を持つ。

【0076】本発明におけるヌクレアーゼは、検出対象となる配列とハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドプライマーを起点として伸長した部分を前記ヌクレアーゼ耐性部位まで特異的に加水分解する作用を持つ。標的配列が存在しない時にはこの分解は起こらず、またたとえ標的配列が存在していてもオリゴヌクレオチドプライマーのハイブリダイズとDNAポリメラーゼによる伸長反応が起きない限り加水分解されることはない。ヌクレアーゼのこのような特性により本発明において反応液中に蓄積する分解産物は、検出対象に対して特異的に、そして直線的に増加し、定量性の高い分析が可能となる。

【0077】また、本発明の利点の一つとして、コンタミネーションの影響を受け難いことが挙げられる。即ち、たとえ反応後のサンプルがこれから反応させようと

する溶液中に誤って混入しても、蓄積した分解産物そのものは新たな鋳型としては機能しないのでこれをもとに反応が進行することがなく実用上大変有利である。

【0078】更に、本発明の固有の効果として、均一系で簡便な操作を提供できる点が挙げられる。DNAポリメラーゼによるdXTPの付加にともない生成するPPiを追跡する方法を採用すれば、付加的なプローブとのハイブリダイズや電気泳動による分離等の操作を全く必要としない反応系を提供できる。PPiは純粋に酵素的な反応によって特異的に測定することができるので、合成と分解反応を行った反応液中でそのまま連続して反応を継続することが可能となり非常に実用的である。本発明のこのような利点は、PCR法による増幅産物を検出するためにはプローブとのハイブリダイズや電気泳動による分離が要求されることと比べるとより明瞭である。

【0079】その他、反応の第一段階で検出対象配列にハイブリダイズしたプライマーをそのまま継続して反応に利用するメリットとして、プライマーを比較的少量しか用意しなくてもよいことが挙げられる。PCRのように増幅産物によってプライマーが消費される系では大過剰のプライマーを用意しなければならないが、本発明では検出対象配列のモル数に対してわずかに過剰のプライマーを用意すれば十分である。そして、同様のことは基質となるデオキシヌクレオシドトリリン酸についてもいえる。即ち、例えばPCRでは伸長する領域に必要な基質を全て用意しなければならない。本発明では、ハイブリダイズした領域に隣接する配列に相補な塩基を少なくとも1種類だけ用意すればよいので試薬構成を単純化できるという利点を有する。

【0080】本発明の付随的な効果として点突然変異の検出に応用可能なことを挙げることができる。即ち、予め点突然変異を起こす部位が判明している時には、この部分に隣接する領域をプライマーとして選び点突然変異の起った時には反応が進行しないように反応系を設定することにより点突然変異の有無を確認することが可能である。以上のように本発明によるポリヌクレオチドの検出方法は種々の利点を有するものであり、遺伝子の分析において有効な方法となることが期待できる。

【0081】

【実施例】以下、実施例に基づいて本発明を更に詳細に説明する。しかしながら、本実施例により本発明の技術的範囲が限定されて解釈されるものではない。

【実施例】HBV・DNAのHBV-e抗原遺伝子の検出

HBV・DNAのHBV-e抗原遺伝子の検出を試みた。ヌクレアーゼには大腸菌由来のエクソヌクレアーゼIII（寶酒造製）を、またプライマーDNAには配列番号3に示す塩基配列を持つオリゴヌクレオチドを化学合成して用いた。

【0082】(1)-1 プライマーDNAの調製

前記配列（配列番号3）のオリゴヌクレオチドは、 β -シアノエチルアミダイト法（J. Am. Chem. Soc., 112, 1253-1254 (1990)）に従って合成した。S化試薬として、3H-1,2-benzodithiole-3-one 1,1-dioxide (Beaucage's Reagent)を用い、3'末端側のT-C間をホスホロチオエート結合としてヌクレアーゼ耐性プライマーDNAを得た。DNA合成機としてCyclone（登録商標）Plus DNA/RNAシンセサイザー（日本ミリポアリミテッド）を用いた。合成したホスホロチオエート化オリゴヌクレオチドは、常法に従いHPLCで精製して使用した。

【0083】(1)-2 塩基配列の検出

プライマーDNAを、標的配列となるHBV・DNAの一部にもつM13ファージDNAと混合し、実際に本発明による反応を行わせた。具体的な反応液の組成は下に示す通りであった。なお、下に示した数値はいずれも最終濃度である。反応が実際に進行しているのかどうかを確認するために、各成分を除いた反応系を設けて結果を比較した。またヌクレアーゼ耐性プライマーの必要性を確認するため同じ配列を持つがヌクレアーゼ耐性を持たないプライマーについても実験を行った。本実施例で用いたプライマーをハイブリダイズさせた場合、3'側に隣接する配列はGであり、従ってその相補鎖の合成にはdCTPが必要である。そしてこのdCTPのヌクレアーゼ分解産物は、dCMPとなる。

【0084】＜反応液の組成＞

第1反応（5 μ l）

10fmol 標的配列（M13ファージDNA上にHBV-e抗原遺伝子領域を持つ1本鎖DNA）

1pmol プライマーDNA

50mM Tris/HCl (pH7.5)

10mM MgCl₂

第2反応（10 μ l）

1unit DNAポリメラーゼIクレノウフラグメント

5units エクソヌクレアーゼIII

10 μ M dCTP (³²P 標識、5 \times 10⁴cpm)

50 μ g/ml 牛血清アルブミン（以下BSAと略す）

10mM ジチオスレイトール

【0085】第1反応では反応液（5 μ l）を100℃で5分間加熱してDNAを1本鎖とした後、65℃で10分間置いてプライマーDNAをハイブリダイズさせた。次いで第2反応に必要な成分を含む試薬液を加えて更に37℃で反応させた。1時間反応させた後、20mMのEDTAを1 μ l加えて反応を停止した。反応を停止した反応液の全量を薄層クロマトグラフィー（薄層：PEI-Cellulose F（メルク（Merck）社製）、展開溶媒：0.4M LiClにより室温で40分間展開）により分離し、ヌクレアーゼ分解産物であるdCMPをオートラジオグラフィーによって確認した。

【0086】図2から明らかなように、検出対象となる配列、クレノウフラグメント、エクソヌクレアーゼIIIのいずれを欠いてもヌクレアーゼ分解産物であるdCMPは検出されず(レーン2-4)、本発明の反応が特異的に進行していることが確認された(レーン1)。なお、レーン1は検出対象配列+全ての試薬成分についての系であり、レーン2は試薬成分のみの系であり、レーン3は試薬成分中クレノウフラグメントを除く系であり、レーン4は試薬成分中、エクソヌクレアーゼIIIを除く系である。

【0087】またプライマーとしてヌクレアーゼ耐性を持たないものを用いた場合には、他の成分を満足する反応系であってもヌクレアーゼ分解産物としてdCMPが蓄積しないことを確認した(図3:レーン1はヌクレアーゼ耐性プライマーを利用、レーン2は修飾を施していないプライマー、即ちヌクレアーゼ感受性のプライマーを利用)。これは、ヌクレアーゼによりプライマーの3'側領域(即ち、dCTPの付加部位)が分解されるためにdCTPが付加できなくなることが原因と考えられる。

【0088】(2) 鋳型特異性

プライマーが検出対象配列と相補性を持つ場合にのみ、ヌクレアーゼによる基質の分解が起きることを確認するため次のような実験を行った。即ち、検出対象配列としてプライマーと全く相補性を持たない配列を用いる場合、及び検出対象配列の存在しない場合という2つの条件について、前記(1)と同じ操作により実際に反応を行った。

【0089】その結果、図4(レーン1:検出対象配列がプライマー配列と相補、レーン2:検出対象配列がプライマー配列と同じセンス配列、即ち相補でない、レーン3:検出対象配列を含まない)に示すように検出対象配列とプライマーDNAが相補的であれば分解産物であるdCMPが蓄積する(レーン1)が、センス配列、即ちプライマーと同じ配列であり相補的でない場合(レーン2)、及び検出対象配列が存在しない場合(レーン3)には分解産物は蓄積しないことが確認された。この実験により、本発明の反応は検出対象配列がプライマーと相補的な配列を持つ時に進行することが立証された。

【0090】(3) 基質(デオキシヌクレオシドトリリン酸) 特異性

基質であるデオキシヌクレオシドトリリン酸がプライマ*

*一に取り込まれるdCTPの時にのみヌクレアーゼによる分解が起ることを確認するために、前記(1)における基質をdGTPに置き換えて反応させた。その結果、図5(レーン1:基質としてdCTPを利用、レーン2:基質としてdGTPを利用、レーン3:マーカーとしてdCMPとdCTPを展開、レーン4:マーカーとしてdGMPとdGTPを展開)に示すとおり基質がdCTPの時にのみ反応が進行し分解産物であるdCMPが確認され(レーン1)、dGTPを加えた時には反応が進行しない(分解産物は生成しない、レーン2)ことを確認した。そして、この結果から本発明による検出方法が点突然変異の検出に利用できることが明らかになった。

【0091】(4) 本発明の検出感度

前記(1)と同じ操作で検出対象となるDNA量を0~1pmolに変化させて本発明による検出方法の感度を確認した(表1参照)。図6(レーン1:検出対象配列を含むDNAを1pmol添加し反応させた、レーン2:検出対象配列を含むDNAを0.1pmol添加し反応させた、レーン3:検出対象配列を含むDNAを0.01pmol添加し反応させた、レーン4:検出対象配列を含むDNAを1fmol添加し反応させた、レーン5:検出対象配列を含むDNAを0.1fmol添加し反応させた、レーン6:検出対象配列を含むDNAを0.01fmol添加し反応させた、レーン7:検出対象配列を含むDNAを1amol添加して反応させた、レーン8:検出対象配列を含むDNAを添加せず、反応させた)に示すように、1fmol(レーン4)のDNAを検出可能なことが確認された。この結果により、本発明による検出方法の感度は極めて高いことが判明した。また本発明による塩基配列検出方法の定量性を確認するため、各バンドを切り出して液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。結果を表1に示す。表1において、(A)及び(B)の値は、各スポットの放射活性(CPM)を示す。0.1fmol~0.01pmolの範囲で定量性を確保できることが確認された。

【0092】なお本実施例では、³²P標識したdCTPの使用量をオートラジオグラフィーのスポットの大きさに差が生じやすい範囲に非標識のdCTPで予め希釈調整している。従って、dCTPに占める標識物の割合を高くすれば、更に高感度を実現することが可能である。

【0093】

【表1】

表1 本発明検出方法の検出感度の検討

検出対象 DNA量	(A) dCTP	(B) dCMP	A-B/Total (%)	dCMP (pmol)	蓄積率 (dCMP/Target DNA)
1pmol	6566	17883	70.9	70.9	70.9
0.1	8805	25204	72.5	72.5	725
0.01	18381	15212	43.7	43.7	4370

27					28
1fmol	32552	1808	3.67	3.67	3670
0.1	31550	681	0.42	0.42	4200
none	35997	547	-	-	

【0094】(5) T4DNAポリメラーゼによる本発明の検出方法

前記(1)におけるクレノウフラグメントに代えてT4DNAポリメラーゼを用い、本発明による塩基配列の検出方法を試みた。T4DNAポリメラーゼは、先に述べたとおり3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を合わせ持つ酵素であるため、ヌクレアーゼ活性を持つ酵素として別の酵素を加えなくても反応系を構成することが可能である。

【0095】T4DNAポリメラーゼを4units用い、反応系を下に示す組成とした。他は前記(1)と同じ条件に基づいて反応を行った。結果は図7(レーン1:クレノウフラグメント+エキソヌクレアーゼのみで検出対象配列を含まない、レーン2:クレノウフラグメント+エキソヌクレアーゼ+検出対象配列、レーン3:T4DNAポリメラーゼのみ、レーン4:T4DNAポリメラーゼ+検出対象配列)に示すとおりである。対照として示した前記(1)の結果に比べるとスポットは小さいが、ヌクレアーゼ分解産物であるdCMPの生成が確認された。このようにT4DNAポリメラーゼを用いればヌクレアーゼ活性を持つ酵素として別の物質を加えなくても本発明による反応が進行することが判明した。

【0096】<反応液の組成>

第一反応(5μl)

10fmol 標的配列

1pmol プライマーDNA

67mM Tris/HCl (pH8.8)

6.7mM MgCl₂

16.7mM (NH₄)₂SO₄

6.7mM EDTA

配列

ATAAACTTGT GGTAGTTGGA GCTG

【0100】配列番号:3

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

配列

AATGCCCTA TCTTATCAAC ACTTC

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の反応原理を示す模式図である。

【図2】本発明によるHBV-e抗原遺伝子の検出方法によって得られたオートラジオグラフィの結果を示す図である。

【図3】本発明による反応系におけるヌクレアーゼ耐性

* 第二反応(10μl)

10mM β-メルカプトエタノール

10μM dCTP (³²P 標識、5 x 10⁴cpm)

50μg/ml BSA

4 units T4DNAポリメラーゼ(寶酒造製)

【0097】

【発明の効果】本発明によれば、遺伝的疾患や感染症の診断に有効な試料中に存在する特定の塩基配列を含むポリヌクレオチドの検出方法及び当該検出方法に使用するポリヌクレオチド検出用キットが提供される。

【0098】

【配列表】

配列番号:1

配列の長さ:25

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

起源

生物名:サイトメガロウィルス(CMV)

配列

CCCCGAAATG GGACCCAGTA CGGAT

【0099】配列番号:2

配列の長さ:24

配列の型:核酸

鎖の数:一本鎖

トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

起源

生物名:ヒト癌遺伝子K i - r a s / 1 2

24

※トポロジー:直鎖状

配列の種類:他の核酸 合成DNA

起源

生物名:HBV・DNAのHBV-e抗原遺伝子

※

25

プライマーの必要性について調査したオートラジオグラフィの結果を示す図である。

【図4】プライマーの配列と検出対象のポリヌクレオチドの塩基配列の相補性とヌクレアーゼ分解産物の関係を調査したオートラジオグラフィの結果を示す図である。

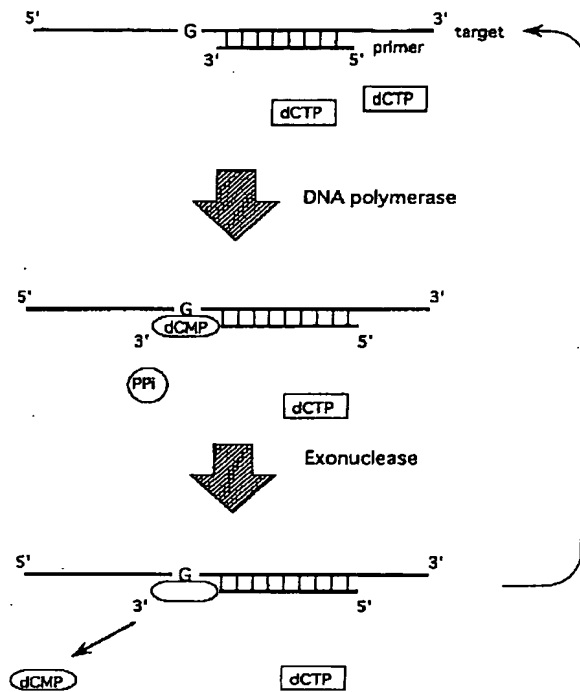
【図5】基質とヌクレアーゼ分解産物の関係を調査した

オートラジオグラフィーの結果を示す図である。

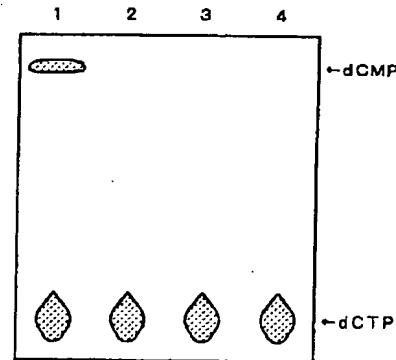
【図6】 標的ポリヌクレオチドの濃度を变化させて感度を調査したオートラジオグラフィーの結果を示す図である。

* 【図7】 T4 DNAポリメラーゼを用いた場合について調査したオートラジオグラフィーの結果を示す図である。

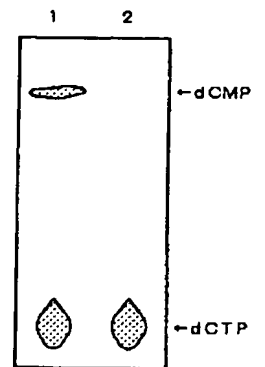
【図1】



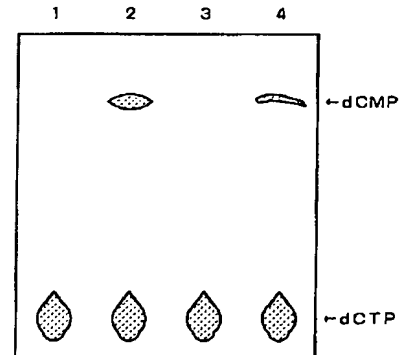
【図2】



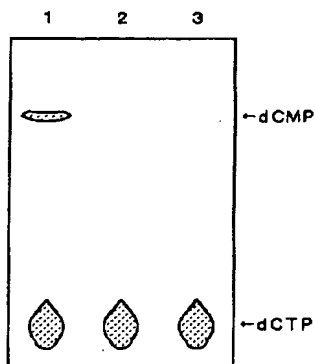
【図3】



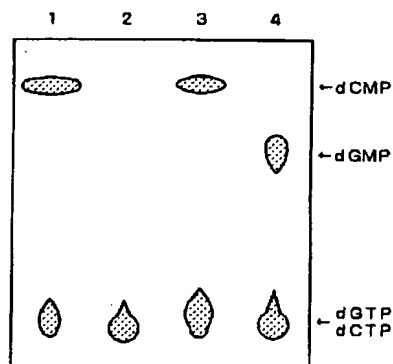
【図7】



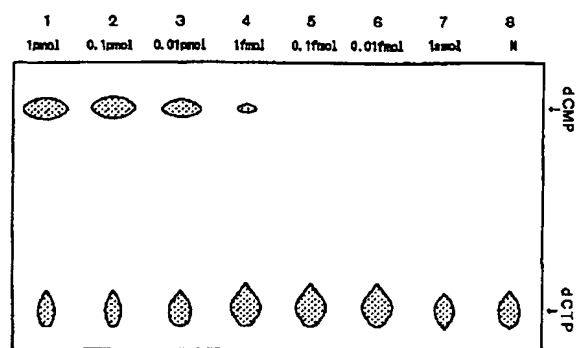
【図4】



【図5】



【図 6】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁶

C 1 2 Q 1/66

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

6807-4B